1897 Omaggio dell'A

Dallo Istituto di Patol. Generale della R. Univ. di Bologna
Direttore: Prof. G. TIZZONI

SULL' AGGLUTINABILITÀ

DEI

GLOBULI ROSSI

FISSATI COLLA

FORMALINA E DEGLI STROMI GLOBULARI

(Contributo allo studio sull'Emoagglutinazione)

pel

DOTTOR G. GUYOT

CASA EDITRICE
DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
MILANO

Dallo Istituto di Patol. Generale della R. Univ. di Bologna
Direttore: Prof. G. TIZZONI

SULL' AGGLUTINABILITÀ

DEI

GLOBULI ROSSI

FISSATI COLLA

FORMALINA E DEGLI STROMI GLOBULARI

(Contributo allo studio sull'Emoagglutinazione)

pel

DOTTOR G. GUYOT

CASA EDITRICE
DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
MILANO

Estratto dalla *Gazzetta degli Ospedali e delle Cliniche*

N. 76 Anno 1908

Stabilimenti riuniti d'ARTI GRAFICHE — Milano, Corso Magenta N. 18

Per quanto in poco meno di un decennio, dacchè Bordet rese noti i suoi fondamentali studi sulla emoagglutinazione ed Erlich coi suoi collaboratori costruirono un edifizio scientifico sulle fondamenta dell' emolisi, la letteratura si sia arricchita di una copiosa raccolta di lavori intesi ad illustrare or l'uno or l'altro argomento, od entrambi contemporaneamente, poichè per molti il fenomeno dell' emolisi va strettamente connesso con quello dell'emoagglutinazione, tuttavia possiamo dire di sapere ben poco di positivo circa l'intima natura dei fenomeni *emolisi ed emoagglutinazione.*

La ragione della mancanza di nozioni sicure che ci illuminino sull'andamento materiale o dinamico dei due fenomeni dipende senza dubbio dalla natura complessa delle sostanze e degli elementi che contengono i veri reagenti del processo. Nessuno vi è p. es. che non comprenda quanto mai sia difficile poter sceverare da sostanze così complesse come i sieri quella parte o quel complesso di componenti dotati della particolare proprietà di agire sui globuli rossi in modo da determinare quei fenomeni che il nostro occhio osserva.

Ond'è che appare lodevolissimo il tentativo di v. Liebermann (1) di arrivare all' interpretazione del meccanismo d' azione dei sieri col sussidio dell'analogia che l'esperimento permette di riscontrare fra essi e sostanze di natura chimica definita, come l' acido silicico, più facilmente accessibile al cimento analitico dell' esperimento, come la ricina, l' abrina, la saponina, la lecitina.

(1) Liebermann. Ueber Hämolyse und Hâmagglutination. Archir fur Hygiene 1907, Bd. 62.

Da parte dei globuli rossi poi, pur essendo la loro costituzione chimica meno complessa e più costante, abbiamo una difficoltà che rende i comuni esperimenti delicati, e qualche volta scomodi per il fatto che si opera, nella tecnica comune, con elementi vivi e per sé stessi molto labili.

Eppure, volendo anche da questo lato semplificare nell'esperimento per meglio arrivare a conoscere i reagenti che sono in giuoco nella produzione dei fenomeni che noi finora conosciamo ancora un po' troppo, dirò così, empiricamente, converrà di eliminare non solo quello che rende scomodo l'esperimento ma anche quanto mano a mano risulti passivo nell'esperimento stesso.

Orbene, per fermarci soltanto all'argomento della *emoagglutinazione* scorrendo la letteratura ci possiamo di leggieri accertare che, mentre ripetuti tentativi sono stati fatti per arrivare alla conoscenza della sostanza agglutinante e molte ipotesi sono state avanzate sulla natura di essa, sia considerata a sè, come in rapporto con altre sostanze affini (agglutinine batteriche, precipitine), poco o punto si sono preoccupati gli osservatori di conoscere la natura della sostanza agglutinabilè. In massima ci si accontenta della facile spiegazione che i globuli rossi sotto l'azione delle agglutinine diventano più viscosi, in qualche caso rigonfi e che per conseguenza si uniscono in grumi, i quali per il loro peso specifico precipitano aumentando ancora durante la precipitazione la massa grumosa. Ch' io mi sappia però nessuno ha dato la dimostrazione della maggiore viscidità acquisita dai globuli rossi sotto l'azione delle sostanze agglutinanti.

Una tale dimostrazione del resto segnerebbe, è vero, un passo, nell'interpretazione del fenomeno dell'agglutinazione e ci spiegherebbe la ragione fisica di esso; ma quello che in questo studio più importa è di conoscere il processo, verosimilmente chimico che prepara l'estrinsecazione del fenomeno fisico.

A tanto io credo si potrà nel miglior modo arrivare quando sarà possibile semplificare l'esperimento nel senso di adoperare per le ricerche sull'emoagglutinazione quella parte del globulo rosso che è attivamente in giuoco nella produzione del fenomeno in istudio.

Per l' avviamento in questo indirizzo sperimentale ritengo potrà giovare la conoscenza dei risultati otteuuti in alcune ricerche da me praticate in dipendenza delle mie esperienze in corso di pubblicazione (1) « Sull' emoagglutinazione bat'erica ». Credo perciò prezzo dell'opera farne oggetto della presente comunicazione.

(1) Ueber bakterielle Hämagglutination. (Bakterio emoagglutinatione. Centralblatt f. Bakteriologie, 1908). Sull' emoagglutinazione batterica. *Policlinico. Sez. Medica* 1908.

I. *Esperienze di emoagglutinazione con globuli rossi fissati colla Formalina.*

Venni nell'idea di ricercare se i globuli rossi fissati colla Formalina conservassero la capacità di agglutinarsi dopo che mi riuscì di dimostrare che i batteri emoagglutinanti fissati colla Formalina non perdevano affatto del loro potere agglutinante.

Alla risoluzione di questo quesito ho annesso importanza essenzialmente per due ragioni: prima per stabilire se l'agglutina zione dei globuli rossi sia un fenomeno vitale, secondo per vedere se, dato che il fenomeno non fosse vitale, la Formalina avesse alcuna influenza sulla sostanza agglutinabile.

È vero che per l'analogia e la parentela che esiste tra agglutinazione dei batteri ed agglutinazione dei globuli rossi, potevasi anche supporre *a priori* che la Formalina non altera la sostanza agglutinabile e che questa non è legata alla vita delle cellule; ciò per quanto noi conosciamo sull'agglutinazione e sui processi di agglutinazione dei batteri uccisi colla Formalina (Fickerdiagnosticum, cultura omogenea di Arloing per la siero agglutinazione tubercolare, ecc.). Però in mancanza di dimostrazione obbiettiva in appoggio all'ipotesi, credetti utile consultare l'esperimento.

Per la tecnica ho proceduto come segue.

Globuli rossi raccolti per defibrinazione e ripetutamente lavati, come di solito, venivano raccolti in acqua salata (Na Cl 0,80 0[0) a cui veniva aggiunta della Formalina in proporzione di 1 : 10. Dopo 24 ore i globuli rossi così fissati venivano lavati per liberarli dalla Formalina, indi ripresi in acqua salata (1) per essere sottoposti alla prova dell'agglutinazione.

Questa veniva praticata o col metodo macroscopico in tubetti da saggio, o col metodo microscopico in goccia pendente ed osservazione estemporanea (5–10 minuti).

I globuli rossi raccolti nel modo descritto, in acqua salata, nella proporzione del 5 0[0 formavano una sospensione omogenea di elementi perfettamente isolati poco o punto diversi nell'aspetto dai globuli rossi non fissati.

(1) Ho ripresi i globuli rossi in acqua salata, anzichè in acqua semplice in considerazione della necessaria presenza del sale per determinare l'agglutinazione (Joos, Eisenberg, Wölk, Bordet).

Ecco tre saggi delle prove eseguite :

Reagenti { Sieri di Uomo e di Cavallo normali.
Globuli rossi di Uomo e di Cavallo normali.

	Siero Uomo		Siero Cavallo
Globuli R. Uomo . .	⊣	(*)	(*) ⊢
« « Cavallo .	+ + +		+ + +

⊣ (*) = tracce di antoagglutinazione
+ + + = agglutinazione completa.

B. Agglutinazione con Batterî emoagglutinanti (Bacterio-emoagglutinazione (*)

Reagenti { Tre stipiti (b, d, r) di Colibatterî emoagglutinanti (**
Globuli rossi di Cavia, Coniglio e cavallo normale.

	Coli *b*	Coli *d*	Coli *r*
G. B. Cavia .	+ + +	+ +	+ + +
» » Coniglio	+ +	+ + +	+ + +
» » Cavallo	+ + +	+ + +	+ + +

C. Agglutinazione con Estratto di Seme di Fagiolo (Emoagglutinazione vegetale secondo Lansteiner e Raubitscek (2)

Reagenti { Estratto di Seme di Fagiolo.
Globuli rossi di Uomo, di Cavia e di Scimia.

Agglutinazione:

G. B. Uomo	+ + +
» » Scimia	+ + +
» » Cavia	+ + +

(**) I batteri di cui mi sono servito per queste prove fanno parte di quelli che furono oggetto di studio nel mio lavoro citato « Sulla emoagglutinazione batterica ».

(2) Vedi: Karl Landsteiner u H. Raubitsceek: Beobachtungen über Hämolyse und Hämoagglutination — *Centralblatt f. Bakteriologie* Orig. Bd. XLV, H. 7, 1908

Da questa triplice serie di esperienze resta dunque stabilito che i *globuli rossi fissati colla formalina conservano la loro agglutinabilità*. Ed aggiungerò che la conservano integra poichè prove di controllo con analoghi globuli rossi non fissati e raccolti in acqua salata, che qui credo per brevità poter far a meno di riportare, dimostrarono come non esista differenza tra l'agglutinabilità dei globuli rossi fissati e di quelli non fissati.

***

II. *Esperienze di agglutinazione con stromi globulari.*

Essendomi risultato dalle esperienze precedenti che i globuli rossi fissati conservano la loro agglutinabilità, feci un passo innanzi per vedere se la parte sensibile all'agglutinazione stesse nello scheletro del globulo rosso o nel plasma.

Presi dei globuli rossi e li misi in acqua distillata e sterilizzata lasciandoveli finchè fosse fuoriuscita tutta l'emoglobina.

Indi sedimentai gli stromi globulari coll'aiuto della centrifuga e dopo aver allontanata l'acqua contenente in soluzione l'emoglobina aggiunsi dell'acqua salata in modo di aver una sospensione di stromi di una evidente torbidezza.

Un saggio della medesima esaminato opportunatamente al microscopio lasciava riconoscere una grande quantità di corpiccioli, ora sottoforma di dischi limitati da un contorno circolare ora ripiegati su sé stessi e riconoscibili per avere l'orlo alquanto più rifrangente del resto. Questo materiale sottoposto alle prove di agglutinazione con sieri, batteri e sostanze vegetali agglutinanti diede reazione positiva ed assai evidente in quanto che gli stromi unendosi a gruppi e quasi cementandosi fra loro formavano delle zollette caratteristiche.

Riporto qui tre esempi di tali prove:

A. Agglutinazione con Siero emoagglutinante.

Reagenti: Siero di Cavallo e di Uomo. — Stromi globulari di Cavallo e di Coniglio.

	Siero Cavallo	Siero Uomo
Stromi gl. Cavallo	—	+ +
» Coniglio.	+ +	+ + +

B. Agglutinazione con batterî emoagglutinanti.

Reagenti < Colibatteri *o* e *d.*
Stromi globulari di Uomo, di Cavallo, di Coniglio

	Coli *a*	Coli *d*	OSSERVAZIONE
Stromi gr. di Uomo	+ + +	—	Nell'esperimento con globuli rossi interi, il Coli *a* è agglutinante per l'uomo non per il cavallo né per il coniglio; il Coli *d* non è agglutinante per l uomo, lo è invece per il cavallo e il coniglio.
» » Cavallo	—	+ +	
» » Coniglio	—	+ +	

C. Agglutinaziene con sostanze vegetali emoagglutinanti.

Reagenti < Estratto di Fagiolo secondo *Landsteiner* a *b a - bischek-*
Stromi globulari di Uomo, di Scimia e di Cavallo.

Agglutinazione:

Stromi g. di Uomo + + +
» » » Cavallo + + +
» » » Scimia + +

L'agglutinabilità degli stromi dei globuli rossi dalle mie ricerche chiaramente messa in evidenza era già stata osservata da Stilmark (1) nei riguardi della ricina ed ancora recentemente da v. Liebermann (2), il quale pure dimostrò che la ricina lega il suo gruppo acido allo stroma (base) de' globuli rossi, si da determinare la fuorescita dell'emoglobina (emolisi) e l'agglomerazione dei globuli, i quali a questo modo vengono agglutinati. Lo stesso autore oltre a dimostrare che gli stromi de' globuli rossi sono agglutinabili dalla ricina, riuscì pure a disagglutinare gli stessi stromi globulari mediante un acido più attivo (acido cloridrico) e presentante più affinità per la base (stroma) del globulo rosso che non il gruppo agglutinante (acido) della stessa ricina.

A queste osservazioni parziali di Stillmark e di v. Liebermann sono di conferma i risultati delle mie esperienze, le quali allargano e rassodano le nostre conoscenze sulla *agglutinabilità degli stromi globulari di fronte a tutte le specie di sostanze emagglutinanti.*

(1) Arbeiten des pharmakologischen Instituts in Dorpat. 1888.
(2) Loco citato.

In conclusione, senza volerci ripromettere troppo lusinghieri vantaggi dell' applicazione allo studio della emagglutinazione dei due fatti fondamentali ora dimostrati, è però lecito di rilevare come da una parte viene acquisito alla técnica un metodo più comodo di quello ora in uso, coll' impiego di globuli rossi fissati o degli stromi: d'altra parte vien stabilito che *precisamente lo stroma globulare contiene la sostanza agglutinabile* e quindi su di essa deve cadere l'indagine analitica per l'interpretazione del fenomeno dell'agglutinazione.

Maggio, 1908.